

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-218466

(43)Date of publication of application : 26.09.1991

(51)Int.Cl.

G01N 33/579
A23K 1/16
A23L 1/03
A23L 1/30
A23L 2/00
A61K 7/00
A61K 37/20
// C12P 19/04
(C12P 19/04
C12R 1:89)
(C12P 19/04
C12R 1:645)

(21)Application number : 02-025192

(71)Applicant : CHIBA SEIFUN KK
MIZUNO DENICHI
SOMA GENICHIRO

(22)Date of filing : 06.02.1990

(72)Inventor : SOMA GENICHIRO
YOSHIMURA ATSUSHI
TSUKIOKA DAISUKE
MIZUNO DENICHI
OSHIMA HARUYUKI

(30)Priority

Priority number : 64 25739
01255210

Priority date : 06.02.1989
02.10.1989

Priority country : JP
JP

(54) PLANT GLYCOLIPID POSITIVE IN LIMULUS TEST, IMMUNE FUNCTION ACTIVATOR, IMMUNE FUNCTION ACTIVATOR FOR ANIMAL, IMMUNE FUNCTION INSPECTING DRUG, IMMUNE FUNCTION INSPECTING DRUG FOR ANIMAL, NON-PHARMACEUTICALS, COSMETICS, FOOD, FUNCTIONAL FOOD, DRINKS, FEED CONTAINING SUCH GLYCOLIPID

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the immune function activator which has large activatability and chemotherapeutic coefficient, and can be dosed in various manners by separating the plant glycolipid positive in Limulus test having specific properties from the plants which man and animal eat normally and refining this glycolipid.

CONSTITUTION: Raw material plants, such as gymnosperm, Monocotyledoneae and Dicotyledoneae, are chopped, dried and crushed at need and thereafter, the plants are suspended in distilled water. The supernatant is recovered and the fractions of $\leq 5,000$ mol.wt. are filtered away. The resulted dry matter is suspended in distilled water to make 50mg/ml and the

suspension is centrifugally separated. The supernatant is recovered. An acid and alkali are alternately added thereto, then the settling and recovering of the supernatant are repeated. The finally recovered supernatant is neutralized with an alkali and is thickened. The concn. soln. is gel-filtered. The plant glycolipid positive in Limulus test which has about $8,000 \pm 1,000$ mol.wt. of 90% purity product by an SDS electrophoresis method, ≥ 1 phosphorus number per molecule, and respectively 6 ± 2 hexosamine number and fatty acid number is recovered. This glycolipid is used as it is or is used by diluting the same to an arbitrary extent and is effective as an oral drug, injection or embrocation. The preservable property thereof is enhanced when prepd. as dry powder.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-218466

⑬ Int. Cl.¹

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)9月26日

G 01 N 33/579
A 23 K 1/16
A 23 L 1/03

3 0 4 C

9015-2G
7110-2B
6977-4B※

審査請求 未請求 請求項の数 23 (全24頁)

⑮ 発明の名称 リムラステスト陽性植物糖脂質、それらを含む免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤、免疫機能検査薬、動物用免疫機能検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料

⑯ 特 願 平2-25192

⑰ 出 願 平2(1990)2月6日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)2月6日 ⑲ 日本(J P) ⑳ 特願 平1-25739

⑳ 発 明 者 柚 源 一 郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
㉑ 発 明 者 吉 村 淳 千葉県千葉市磯辺3-26-7
㉒ 発 明 者 月 岡 大 輔 千葉県千葉市春日1-21-17
㉓ 出 願 人 千葉製粉株式会社 千葉県千葉市新港17番地
㉔ 出 願 人 水 野 伝 一 神奈川県鎌倉市岡本18
㉕ 出 願 人 柚 源 一 郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21

最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

リムラステスト陽性植物糖脂質、それらを含む免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤、免疫機能検査薬、動物用免疫機能検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料

2 特許請求の範囲

(1) 次の特性を有するリムラステスト陽性植物糖脂質。

分子量: 8, 000 ± 1, 000 (SDS電
気泳法)

リン数: 1以上/分子

ヘキソサミン数: 8 ± 2/分子

脂肪酸数: 8 ± 2/分子

(2) 植物が単子植物、双子葉類、被子植物、シダ植物、ソウ類、菌類及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである。請求項1記載のリムラステスト陽性植物糖脂質、

(3) 単子葉類がイネ科植物である。請求項2記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(4) イネ科植物がイネである。請求項3記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(5) イネ科植物が麦である。請求項3記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(6) 麦が小麦、大麦、裸麦、からす麦、えん麦及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである。請求項5記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(7) ソウ類がカッソウ類、紅ソウ類、緑ソウ類、ランソウ類及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである。請求項6記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(8) 緑ソウ類がクロレラである。請求項7記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(9) 菌類が担子菌類、子ノコ菌類及びそれらの混合物からなる群から選択されるものである。請求項8記載のリムラステスト陽性植物糖脂質。

(10) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物糖脂質、

物質の少なくとも1種を含む免疫能活性化剤。

(11) 免疫能性が骨形成促進能である、請求項10記載の免疫能活性化剤。

(12) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物性物質の少なくとも1種を含む動物用免疫能活性化剤。

(13) 免疫能性が骨形成促進能である、請求項12記載の動物用免疫能活性化剤。

(14) 免疫能性が発芽促進能である、請求項12記載の動物用免疫能活性化剤。

(15) 免疫能性が発芽促進能である、請求項12記載の動物用免疫能活性化剤。

(16) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物性物質の少なくとも1種を含む免疫能性薬。

(17) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物性物質の少なくとも1種を含む動物用免疫能性薬。

(18) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物性物質の少なくとも1種を含む医薬部外品。

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、リムラステスト陽性植物性物質に関する。

より詳細には、本発明は、リムラステスト陽性植物性物質及びその少なくとも1種を含む免疫能活性化剤、動物用免疫能活性化剤、免疫能性薬、動物用免疫能性薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料等に関する。

〔従来の技術〕

生物には、生体の内部環境が外来性及び内因性の異物によって擾乱されるのを防ぎ、生体の恒常性を維持するための免疫能性が備わっている。従って、免疫能性の低下は健康の悪化、各種疾病の発病、老化促進の原因となり、その活性化は健康向上、各種疾病の発病防止、治療、老化防止につながる。

このため、免疫能性を活性化させる物質の提供

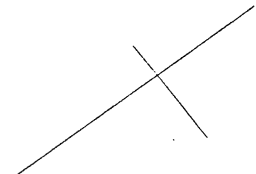
(19) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物性物質の少なくとも1種を含む化粧品。

(20) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物性物質の少なくとも1種を含む食品。

(21) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物性物質の少なくとも1種を含む機能性食品。

(22) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物性物質の少なくとも1種を含む飲料。

(23) 請求項1記載のリムラステスト陽性植物性物質の少なくとも1種を含む飼料。



が要請されており、現在、PSK〔別名クレステン（興羽化学株式会社の登録商標）〕、レンテナン（味の素株式会社の登録商標）、ベスタニン（日本化薬株式会社の登録商標）、ソニフィラン（料研製薬株式会社の登録商標）、OK-432〔キャンサー ケモセラピー レポートアップ 1 (Cancer Chemotherapy Reports Part 1), vol. 58, No. 1, 10頁 (1972)〕、別名ビシバニール（中外製薬株式会社の登録商標）〕等が知られている。

又、リムラステスト陽性（従って説明する）の植物性物質としては、大腸菌LPS（菌多糖体）、百日咳菌LPS、サルモネラ菌LPS等の腸管菌性物質の存在は知られており、各種実験で利用されているが、毒性が高いために、用途は阿る実用化されていない。リムラステスト陽性植物性物質についてはその存在すら報告されていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

従来の免疫機能活性化剤のうちで、PSK、レンチナン、ベスタチン、ソニフィランにはTNF産生能がないので、それらの免疫機能活性化能は低い。

一方、OK-432にはTNF産生能があるが、大量投与が必要であることから、発熱、悪寒、血圧低下、血小板減少等の副作用の発生が避けられず、従って化学療法係数が小さい。更に、生産工程に、微生物培養と極めて煩雑な分離、精製が含まれるために生産コストが高いという問題点もある。加えて、適度な経口投与や経皮投与では効果がないので、投与上の便宜に欠ける。

ここで「TNF」とは、マクロファージにより産生される腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor)の略称[ザジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(The Journal of Biol. Chem., 260, 2345~2354頁(1985年)]であり、マクロファージの活性が高まるにつれてその産生量は増していく。「マ

クロファージ」は、免疫担当細胞の一種であり、動物体内のほとんど全ての組織に分布し、粒子状の異物や体内の老廃細胞などを捕食して消化する「大型のアメーバ状細胞の総称である。『化学療法係数』は、薬物に対する宿主の最大耐量と、病源面に対する薬物の最小有効濃度の比をいい、この値が大きい程すぐれた化学療法剤とされる。

本発明は、これら従来技術の欠点を解消された、高い免疫機能活性化能を有す、化学療法係数が大きくかつ生産コストの低い、しかも、静注投与、経口投与、皮膚塗布が可能ならミラステスト陽性植物抽出物を提供するために創案されたものである。ここで「ミラステスト」とは、1968年にレヴィン(Levin)により創案された、カプトゲン血球抽出液と発色合成基質を用いたエンドキシン定量法である。

従って、本発明の目的は、高い免疫機能活性化能を有す、化学療法係数が大きくかつ生産コストの低い、しかも、静注投与、経口投与、皮膚投与が可能ならミラステスト陽性植物抽出物を提供

すること、及び、このミラステスト陽性植物抽出物の少なくとも1種を含む免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤、免疫機能検査薬、動物用免疫機能検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料等を提供することを目的とする。ここで「少なくとも1種を含む」とは、本発明のミラステスト陽性植物抽出物は各別に使用できることはもちろん、その意図される用途が阻害されない限り、それらの2種以上を任意に組み合わせ、又、更に他のいずれの物質とも組み合わせで使用できることを意味する。

【課題を解決するための手段】

原料植物

本発明で使用できる原料植物は、ミラステストで陽性を示す成分を含むものならばいずれでもよい。例えば、単子葉類、双子葉類、シダ植物、ソウ類、菌類を個別に或は混合して使用できる。

単子葉類としては、例えば、マツ科植物を使用

できる。

単子葉類としては、例えば、イネ科、アヤメ科、ショウガ科、サトイモ科、ユリ科の植物を使用できる。イネ科植物としては、例えば、イネ、粟を使用できる。粟は小粟、大粟、薄粟、からす粟、えん麦その他いづれの種類でもよく、又、それらの混合物でもよい。

双子葉類としては、例えば、アカネ科、アブラナ科、ワリ科、クスノキ科、クルミ科、ゴショウ科、セリ科、ツツラフジ科、ドクダミ科、ナス科、バラ科、マツタビ科、マメ科、ミカン科、モクレン科、ニクズク科の植物を個別に或は混合物として使用できる。

シダ植物としては、例えば、トクサ科、ゼンマイ科の植物を個別に或は混合して使用できる。

ソウ類としては、例えば、カッソウ類、紅ソウ類、緑ソウ類、ランソウ類の植物を個別に或は混合物として使用できる。緑ソウ類としては、例えばクロレラを使用できる。

菌類としては、例えば、担子菌類、子ノコ菌類

の植物を個別に反応混合して使用できる。

リムラステスト陽性植物組織質の抽出・含量測定

以上に述べた原料植物中の本発明のリムラステスト陽性植物組織質の抽出・含量測定は、例えば、生化学工業株式会社からトキシカラーシステムという名称で市販されている試験セットを使用して実施できる。即ち、原料植物を同システムのしS-1セットと合わせて発色させ、その発色の強さを、同じく同セットのB-1-2セットを使用して作成した検量線と対比させればよい。

又、本発明のリムラステスト陽性植物組織質は、以下に述べる方法で分離・精製できる。

リムラステスト陽性植物組織質の分離・精製

①原料植物を必要に応じて適宜細切、乾燥、粉砕した後、蒸留水によく懸濁し、上清を回収する。

例えば、原料植物が穀類の種子である場合は、外皮をつけたまま、或は、外皮を除いた後に簡単に砕くか、又は、食用に供せられている程度の粉末になるまで粉砕し、得られた粉末に水を加えて分散液とし、攪拌した後、沈降物を静置又は遠心

分離により除去するか、粉末に水を加えて練って得られるドフをミキサー中でゆるやかに水洗し、沈降物を除去すればよい。

この抽出操作の際の種子の粒度、水の温度、濃性、添加量、攪拌の速度、時間、遠心分離の際の条件等は特に制限する必要はない。しかし、便宜上、抽出水の温度は、穀類種子に含まれる澱粉の糊化を招きしない50℃以下とすることが好ましい。又、水の添加量は、穀類の種類、粒度により異なるが、穀類種子の割合が70w/v%以下、望ましくは20～50w/v%程度とすると操作上便宜である。更に、攪拌の速度は、起泡を引き起こさない程度のものであることが好ましい。なお、この段階の操作迄で、本発明のリムラステスト陽性植物組織質の純度は、リムラステスト活性データから判断して、例えば小麦種子の場合には約30倍に上昇する。

②純度を更に上げるためには、この上清を常法に従って膜外濾過に付して分子量5,000以下の成分を除去すればよい。

るので、37℃に保持した遠心分離器を使用して遠心分離操作に付す。なお、この際使用する離心機も特定のものである必要はない。

③上清を回収して水洗し、4℃で再び遠心分離操作に付す。

④上清を回収し、アルカリを加えて中和し、常法に従って膜外濾過で濃縮する。この際使用するアルカリも特定のものである必要はない。

⑤次いで常法に従ってゲル濾過に付して、リムラステスト陽性成分を回収して併せる。ゲル濾過用の担体としては、例えばセファデックス (Sephadex) G-75、G-100、セファクリル (Sephacryl) S-200、セファロース (Sephacrose) 8B [以上は米国ファルマシア社 (Pharmacia Inc.) 製]、バイオゲル (Bioigel) P-100 [バイオラッド (Bio-rad Inc.) 社製]、トローバルHW-50、HW-55 (東洋曹達工業社製) を使用できる。層析柱はpH3～10のものならいずれでもよい。

⑥得られた乾燥品を、50mg/mlになるように蒸留水に懸濁し、遠心分離操作に付して上清を回収する。

⑦この上清を水で浄化し、酸を添加して酸性にすると沈殿が生じる。この際使用する酸は特定のものである必要はなく、例えば、トリクロロ酢酸 (以下、TCAと称す)、過塩素酸、トリフルオロ酢酸、酢酸、ジクロロ酢酸を使用できる。

⑧次いで、遠心分離操作に付して沈殿を回収して蒸留水で洗浄し、再度遠心分離操作に付して沈殿を回収する。

⑨沈殿を蒸留水に懸濁し、沈殿が溶解するまでアルカリを加える。この際使用するアルカリも特定のものである必要はなく、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、炭酸ナトリウム、酢酸ナトリウムを使用できる。沈殿の溶解時に塩基性がpH11より大きくなると目的の糖質が失活するので注意が必要である。

⑩次いで酸を加えてpH8としてから37℃に加熱し、更に酸を加えて酸性にすると沈殿が生ず

例えば、トリス-HCl又はリン緩衝液を使用できる。

③次いでこの固分に蛋白分解酵素を加え、37℃で2時間以上インキュベーションして残存蛋白質を分解し、得られた酵素処理液を常法に従って膜ろ過により濃縮する。なお、この際使用する蛋白分解酵素も特定なものである必要はなく、例えば、V8プロテアーゼ、キモトリプシン、トリプシン、サーモライシンを単独で、或は任意に組み合わせで使用できる。市販品としては、例えば、プロナゼB(科研化学社)、プロティネースK(メルク社)を使用できる。

④次いでこの固分を常法に従って、例えば、ファルマシア社製のFPLCシステムでファルマシア社製のモノQ-セファロース(Sephharose)、Q-セファロース(Sephharose)を使用して陰イオン交換クロマトグラフィーに付してリムラステスト陽性画分を得る。

⑤次いで、常法に従って乾燥のためにゲル透過に付してリムラステスト陽性画分を回収する。

性TNF産生促進能、内因性TNF産生能、カーボン除去能、骨形成促進能、産卵促進能、卵巣増殖促進能により確認した。

内因性TNF産生促進能、産生能

動物体内にTNFを産生させるためには、産生前駆(プライミング)段階と産生開始(トリガリング)段階とが必要であることは、カースウェル(Carewell)らにより、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA.) 72, 3666~3670頁(1975年)に報告されており、その後、各段階で使用出来る薬剤の検討もすすめられている。プライミング段階開始のために投与される薬剤が「プライマー」(内因性TNF産生促進剤)であり、トリガリング段階開始のために投与される薬剤が「トリガー」(内因性TNF産生剤)である。本発明のリムラステスト陽性植物画質は、既にその有用性が確立されているビシバニールと同程度にプライマーとして、又、トリガ

以上の操作により、例えば小麦種子の場合には、当初活性の約20%が回収され、純度約95%の精製画質が得られ、又、段階③終了時の純度と比べ約1000倍の純度(小麦種子の場合)になる。

リムラステスト陽性植物画質の特性

通って実施例中で詳述する如く、本発明のリムラステスト陽性植物画質の96%純度画質の分子量はおよそ8,000±1,000(SDS電気泳動法)、リン数は1以上/分子、ヘキサミン数は8±2/分子、脂肪酸数は8±2/分子である。

提供の形態

本発明のリムラステスト陽性植物画質はそのまま、或いは任意の程度に希釈した形で提供できる。又、保存性を高めるために、凍結乾燥や噴霧乾燥などの任意の手段により乾燥粉末として提供することもできる。これらはいずれも常法で生産できる。

免疫活性化能の測定

本発明のリムラステスト陽性植物画質の免疫活性化能は、マクロファージ活性を通じての内因

ーとしても測定する。

TNF活性は、L929細胞[プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー 72, 3666~3670頁]に対する細胞毒性を基にして、次のようにして測定する。

L929細胞を、5%牛胎児血清を加えたイーグルミニマムエッセンシャル培地(以下、MEM培地と書く)で育成し、 8×10^4 個の細胞が100μlの同上培地に含まれる様にし、96穴の平板プレートで育成する。育成条件は37℃、2時間、5%CO₂、湿度100%であり、通常の細胞培養に用いられる方法でよい。その後、アクチノマイシンDを培地中に許濃度1μg/mlとなるように加え、培養液の量を150μlとする。即座に、媒体を適当にMEM培地で稀釈したものを50μl加える(この稀釈比率を適宜調整し、ED₅₀を求める事ができる)。更に、最終濃度200μlとなったL929細胞を上記条件で18時間培養する。

細胞障害性を測定するには、まず全培養液を除去し、ついで0.1%クリスタルバイオレットを含む1%メタノール溶液を加えて固定染色する。クリスタルバイオレットは全骨髄細胞を染色するが、死細胞は染色後にプレート表面より水洗で除去されるので、生存細胞の結果から細胞障害活性を直接測定できる。この染色度をOD_{550nm}での吸光度を指標として測定し、対照群に対する染色度と比較する事で細胞障害活性を測定する。活性の定義は次の様に行う。

L929細胞が50%生存できる濃度の抑制率(N)を求める。対照としてワサギTNS【腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Serum)】を使用し、このワサギTNSの活性n(単位/mg)を 2.4×10^4 単位/mg/mgのTNP- α を用いて決定する。このワサギTNSのED₅₀を与える抑制率(C)を求める。機体活性(単位/mg)は $\frac{N}{C} \times n$ で計算する。

科として使用する。即ち、鶏胚髄頂骨を⁴⁵Caで標識した後、薬剤を含む培地(処理解)と薬剤を含まない培地(対照群)で別々に培養後に、骨に残存する⁴⁵Ca量と、培養中に培地中に溶出した⁴⁵Ca量とを測定し、処理解、対照群における⁴⁵Ca溶出率をそれぞれ次式により計算する。

$$^{45}\text{Ca} \text{ 溶出率} = \frac{^{45}\text{Ca} \text{ 溶出量}}{^{45}\text{Ca} \text{ 残存量} + ^{45}\text{Ca} \text{ 溶出量}}$$

薬剤の効果は次のT/C比で表す。

$$T/C \text{ 比} = \frac{\text{処理解の}^{45}\text{Ca} \text{ 溶出率}}{\text{対照群の}^{45}\text{Ca} \text{ 溶出率}}$$

理論的には、このT/C比が1より大きければ薬剤効果があることになる。なお、後記実験例においては、骨体間のばらつきによる影響を避けるために、同一鶏の胚髄頂骨(2本存在する)の一方を対照群で、他方を処理解で使用した。

骨形成促進、骨吸収抑制効果

本発明のリムラステスト陽性植物抽出物を投与した鶏から産まれた雛の数及びその雛の強度を測定することにより確認する。

カーボン除去能

コロイド状カーボンの血中からの除去がマクロファージ活性の指標となることは古くから知られている(日本細菌学会教育委員会編、細菌学技術叢書5「マクロファージの機能と測定法」、98頁、昭和60年(株)東照出版発行)。従って、キャンサー リサーチ(Cancer Research)、28、1968年8月号の1531~1532記載の方法に準拠し、静置されたカーボンの除去率を指標に、度厚性を与えられたリムラステスト陽性植物抽出物の免疫細胞活性化能を測定する。

骨形成促進能

破骨細胞活性化試験で確認する。

破骨細胞は、骨組織中の古い骨をこわす骨吸収担当細胞である。破骨細胞の活性化により代償的に骨芽細胞が活性化され、骨形成が骨吸収よりも優位の状態になる結果、骨形成が促進されると考えられる。

破骨細胞活性化試験では、鶏胚髄頂骨を実験試

験雛の取引は農林事務所官達により規制されている。現行の昭和54年12月25日付け改正54畜A第5136号通達によれば、鶏卵はその重量、外観検査、透光検査の結果に基づき等級付けされているが、輸送中、取扱い中、使用中等における鶏卵の破損を防止する目安となる殻強度についての記載はない。只、外殻について、「J」1S一種殻強度B、B以上のもの」とのみ規定している。しかし、外殻いくら丈夫であっても、輸送中等の振動、圧みによる鶏卵の破損を防止できないことは自明である。このため、科事やスーパー等の大口需要者と生産者との間には、一定以上の殻強度を有する鶏卵のみを取引対象とする例も少なくなく、その際には、 $4 \text{ kg} / \text{cm}^2$ 以上であれば申し分ないとされている。

なお、現在のところ、鶏卵殻強度を高める効果を持つ薬剤、飼料等の開発、販売は知られていない。

リムラステスト陽性植物抽出物の用途

本発明のリムラステスト陽性植物抽出物は種々

な用途に使用できる。

その第1の理由は、原料が人間その他の動物により常食されているものなので、人間その他の動物への投与に当り憂慮すべき問題点が皆無であることにある。

第2の理由は、そのまま、或いは任意の程度に希釈した形で、又、乾燥粉末として提供することのできる点で、提供できる形態が極めて多岐に達している点にある。

第3の理由は安価であることにある。

このような利点を持つ本発明のリムラステスト陽性植物繊維質の一つの用途は、その免疫機能活性化能をそのまま生かした免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤である。

第2の用途は、その免疫機能活性化能を指標にして人間その他の動物の免疫機能をチェックするための免疫機能検査薬、動物用免疫機能検査薬である。

第3の用途は、その免疫機能活性化能の発現を維持して配合される医薬部外品、化粧品、食品、

機能性食品、飲料、飼料等である。例えば、本発明のリムラステスト陽性植物繊維質を配合した化粧品は皮膚の老化防止、新規代細胞増進に役立つので、常に、又、東長く皮膚を新鮮に保つのに役立つ。

提供できる剤の製造方法

これら免疫機能活性化剤等のいずれもが常法で製造できる。例えば、免疫機能活性化剤、動物用免疫機能活性化剤は医薬品又は動物薬製造の常法に従って、錠剤として、或いは静注薬、器注薬として単独で、或いは糖類との配合物として処方される。又、皮膚にはマクロフンジーが多いので、皮膚塗布剤として投与するとより高い効果が得られる。

以下、実施例、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

実施例1

①小型ニードに、1、0日%の灰分を含む硬質小麦粉（アメリカ又はカナダ産のハードレットス

プリング）（3、120g）を入れ、2、03%の蒸留水を加えて10分間攪拌してドゥとした。15分間の静置後に10%の水を加えてゆるやかに攪拌してデンプン乳液を洗い出し、同時に可溶性成分を抽出させた。この抽出液を5℃の冷蔵庫中で12時間静置したのちデンプン等の沈降物を除去した。上澄み液を真空乾燥して201、1gの粉末を得た（粉末A）。

更に、残留ドゥに5%の蒸留水を加えてゆるやかに攪拌し、以下、上記と同様に処理して40、1gの粉末を得た（粉末B）。

②これら粉末A、Bをアミコン社製膜外透選膜HF-Lab1に供し、分子量範囲5、000については中空系カートリッジHF-Lab1PM5を、分子量範囲10、000については中空系カートリッジHF-Lab1PM10を取り付けて膜外透選を行った（温度5〜10℃、入圧25psi（1、78kg/cm²）、出圧15psi（1、06kg/cm²））。その結果に基づき、各部分を次のように命名した。

粉末A：分子量5、000以下の部分をa；

分子量5、000以上の部分をa；

粉末B：分子量5、000以下の部分をb；

分子量5、000以上の部分をb；

粉末A：分子量10、000以下の部分をa；

分子量10、000以上の部分をa；

粉末B：分子量10、000以下の部分をb；

分子量10、000以上の部分をb；

これら各部分を後記実施例1に詳述する方法に従ってリムラステストに付した。分子量5、000以上の部分には多量のリムラステスト陽性成分が存在するが、分子量5、000以下の部分にはほとんど存在しないことが確認された。

③上記粉末a₂の30gを1%三角フラスコに入れ、500mlの蒸留水を注いで、80分間ステラレーで攪拌した後、日立冷却加熱遠心機SCR-20B（ローターRFR16を準備に4℃に冷却しておいた）で4℃で遠心分離操作（10、000g×10分）に付して上清を回収した。

④この上清を1ℓ三角フラスコに入れ、氷浴下（凍結約2℃）、スターラーで攪拌しながら、事前に2℃に冷却してあった100%TCA水溶液20、5mlを滴下し、滴下終了後氷水中に10分間放置した。

⑤次いで前記と同様にして4℃で遠心分離操作（10、000g×10分）に行して沈澱を回収し、氷水中で冷却下、300mlの蒸留水と共に500mlのビーカーに入れて懸濁し、氷水中で冷却し、前記と同様にして4℃で遠心分離操作（10、000g×10分）に行して沈澱を回収した。

⑥この沈澱を1ℓビーカーに入れ、蒸留水500mlで懸濁し、1N水酸化ナトリウム溶液約3、5mlを使用して中和（pH7）し、ついで、氷水中で冷却しながら、1N水酸化ナトリウム溶液約2mlを追加して0、02N水酸化ナトリウム溶液になるようにして沈澱を溶解した。

⑦1N塩酸約1、5mlを加えてpH8とし、次いで100mlの蒸留水を加えた後に1ℓ三角フ

ラスコに移して37℃のインキュベーター内で30分間ゆっくり振盪した。

⑧100%TCA水溶液30mlを加えて混合した後、37℃のインキュベーター内で10分間ゆっくり振盪してから、約37℃に恒温した遠心分離器トミーC0100R（トミー機器社製）を使用して遠心分離操作（3、000g×10分）に付した。

⑨上清を回収して氷浴し、4℃で遠心分離操作（10、000g×10分）に付した。

⑩上清を回収して10N水酸化ナトリウム溶液約3、6mlで中和してpH7とし、無外濾過器（東洋濾紙UHP-150、フィルター：UK-10、N₂圧：4、0kg/cm²）で濾過した。

⑪得られた濾液50mlを、セファロース（Sepharose）6Bカラム【米国ファルマシア社（Pharmacia Inc.）製、カラムサイズ：5cm（内径）×100cm（2ℓ）】を使い、ゲル濾過【置換液：10MM トリス-HCl/10mM NaCl（pH7、5）、

流速：50ml/時】に行して、各20mlの画分を得た。

⑫初めから43番目から56番目迄の画分280mlを併せ、ブロナーゼE（科研化学社）450μgを加え、室温下、37℃に2時間保温した後、無外濾過器（東洋濾紙UHP-62、フィルター：UK-10、N₂圧：4、0kg/cm²）で濾過した。次いで、ファルマシア社製FPLCシステム（カラム：モノQHR10/10）を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mM トリス-HCl（pH7、5）と10mMのNaClを含む置換液で試料をカラムに付した後、上記置換液に更に185mMのNaClを含む組成をした液（200ml）でカラムを洗った。次いで、185mMから1MのNaCl濃度勾配になるようにNaCl濃度を増加させながら全量400mlで目的糖タンパク質を溶出させ、各2mlの画分を回収した。リムラステスト陽性が確認された、濃度勾配をかけてから5～8番目の画分を併せて、糖タンパク質約82%のB

ms【糖型：3、03ms（リムラステストによる大綱値）PS換算値である。以下の糖タンパク質も全てこの換算値である）、糖：0、23mg、蛋白：0、04mg】を回収した。

⑬次いでその8mlを、セファデックス（Sephadex）G-25【カラム：2、0cm（内径）×20、2cm（66ml）】を使ってゲル濾過（置換液：水）に行して各3mlの画分を回収した。リムラステスト陽性の確認された第9～12番目の画分を併せて、糖タンパク質約95%の12ml（糖タンパク質：2、7mg、糖：0、18mg、蛋白：0、03mg）を回収した。糖はフェノール-硫酸法で、蛋白はローリー法で測定した。なお、この画分は、陰イオン交換クロマトグラフィーにより酸性であることを確認した。又、SDSゲル電気泳動法による分子量は6、000～10、000だった。

⑭上記画分を-80℃で凍結後に恒量になるまで凍結乾燥し、重量を測定したら0、75mgあった。（以下、この凍結乾燥標品をCHFと称す）

このC H Fのリムラス活性を後記実験例1記載の方法で測定したら2.7mgに相当するので、その比活性は $2.7 \div 0.75 = 3.6$ になる。また、以上の精製で、実物質として存在し得る単体の糖は実質上全て除去されたと考えられるので、検出された糖は全て、糖脂質であるC H Fを構成している糖と考えられる。従って、この段階でのC H Fの純度を重量に基づいて計算すると、蛋白質 $= 0.03 \text{ mg}$ 、糖脂質 $= 0.75 - 0.03 = 0.72 \text{ mg}$ だから、 $0.72 \div 0.75 \times 100 = 96 (\%)$ である。

C H Fの特性

分子量

C H Fを蒸留水に溶解して 1 mg/ml 溶液を調製し、その $4 \mu\text{l}$ を 1.5 mm のトレフチューブに入れた。これに、別途、 1 mM のEDTAに2.5% SDS、5%メルカプトエタノール、 10 mM トリス塩酸(pH 8.0)を加えて調製したSDS処理液 $1 \mu\text{l}$ を加え、この溶液を3分間沸騰水に浸した。ファルマシア社製のファスト

システム(Phast System)を使用し、電極との間にSDS-バッファー ストリップ(Buffer Strip)(ファルマシア社製)が介在せられた $1 \mu\text{s}$ の上記溶液をゲル(ファルマシア社製のファスト ゲル グラディエント(Phast Gel Gradient 8-25))に塗付け、最大電圧250V、最大電流10mAにセットして泳動を開始させた。泳動終了後、クマシー染色と銀染色における挙動を観察した。

クマシー染色では、染色液としてファルマシア製の0.1%ファスト ゲル ブルー(Phast Gel Blue) Rを、脱色液として、メタノール：酢酸：蒸留水(容量比3:1:6)の溶液を使用し、次の順序で染色・脱色を行った。
1150℃で8分間染色
2160℃で5分間脱色
3160℃で8分間染色
4160℃で10分間脱色
5160℃で5分間脱色(グリセロール、酢酸、

蒸留水の容量比5:10:85溶液)

6)乾燥

銀染色は、次の順序で行った。

1150℃で2分間、洗淨液(エタノール、酢酸、

蒸留水の容量比5:1:4溶液)で処理

2150℃で2分間、洗淨液(エタノール、酢酸、

蒸留水の容量比10:5:85溶液)で処理

3150℃で4分間、洗淨液(エタノール、酢酸、

蒸留水の容量比10:5:85溶液)で処理

4150℃で6分間、埋蔵液(8.3%グルタル

ジアルデヒド)で処理

5150℃で3分間、洗淨液(エタノール、酢酸、

蒸留水の容量比10:5:85溶液)で処理

6150℃で5分間、洗淨液(エタノール、酢酸、

蒸留水の容量比10:5:85溶液)で処理

7150℃で2分間、洗淨液(脱イオン水)で処

理

8150℃で2分間、洗淨液(脱イオン水)で処

理

9140℃で13分間、0.25w/v%硝酸銀

で処理

10130℃で30秒間、洗淨液(脱イオン水)で

処理

11130℃で30秒間、洗淨液(脱イオン水)で

処理

12130℃で30秒間、現像液(0.04v/v

%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナ

トリウム洗淨液)で処理

13130℃で4分間、現像液(0.04v/v

%ホルムアルデヒド+2.5w/v%炭酸ナ

トリウム洗淨液)で処理

14150℃で2分間、反応停止液(5%v/v%

酢酸)で処理

15150℃で3分間、促進液(酢酸、グリセロ

ール、蒸留水の容量比10:8:85溶液)で

処理

16)乾燥

糖脂質は銀染色に染まるが、クマシー染色には染まらない性質を利用して染色帯を観察したら、分子量8,000 \pm 1,000の位置にC H Fの

主要染色帯が検出された。同様にして大腸菌 LPS の染色帯を観察したら、階段状に連続する染色帯が観察され、染色強度が最高の染色帯の分子量は $30,000 \pm 5,000$ であると推論された。百日咳菌 LPS では、分子量 $6,000 \pm 1,000$ と $9,000 \pm 1,000$ の位置に染色強度が最高の染色帯が観察された。

④ リン含有量

チェントリバラ (Chen-Toribara) 法 [「アナリチカル ケミストリ (Analytical Chemistry)」, vol. 28, 1758-1759 頁 (1956 年) に準拠して次の通りに行った。

CHF を蒸留水に溶解して、 $25 \mu\text{g}$ の CHF を含む $20 \mu\text{L}$ の溶液を調製し、小試験管に入れた。 $20 \mu\text{L}$ の $5.0 \text{ v/v} \%$ 硫酸を添加し、 160°C で 2 時間加熱した。次いで、 $20 \mu\text{L}$ の $10 \text{ v/v} \%$ 過塩素酸を添加した後にガスバーナーで 1 分間加熱して炭化させた。その後に 0.5 mL の蒸留水、次いで 0.5 mL の反応試薬 (1 m

の 5 N 硫酸、 2 mL の蒸留水、 2 mL の $2.5 \text{ v/w} \%$ モリブデン酸アンモニウム及び 1 mL の $10 \text{ v/w} \%$ のアスコルビン酸を混合して調整し、その 0.5 mL を使用) を添加して室温で 30 分間放置した後に、 820 nm での吸光度 (OD₈₂₀) を測定した。なお、検量線作製の試料としては、リン酸二水素カリウム (和光純薬社製) を蒸留水で希釈し、リン量としてそれぞれ $2.5 \mu\text{g}$ 、 $1 \mu\text{g}$ 、 $0.25 \mu\text{g}$ 、 $0 \mu\text{g}$ を含む 0.5 mL の溶液を調製して使用した。なお、リン 1 g はリン酸二水素カリウム 4.39 g に相当する。得られた結果を次表 1 に示す。

表 1

OD ₈₂₀	検 体
	リン酸二水素カリウム (リン換算値: μg)
0.002	0
0.150	0.25
0.620	1.0
1.559	2.5
	CHF (4 検体) (換算値から計算した リンの重量: μg)
0.036	0.1
0.073	0.2
0.104	0.3
0.139	0.4

注: CHF のデータは、無機リンの混入 (例えば、リン酸緩衝液に由来する) による誤差を避けるために、加熱処理をしていない封筒のデータを減じた値である。

CHF の分子量を $8,000$ と仮定し、上表の結果に基づいて CHF の 1 分子当たりのリン数を次式により計算すると 1~4 になる。

$$\text{リン数} = \frac{\text{リン重量} \times 10^{-4} \times \frac{1}{25 \times 10^{-4}} \times \frac{1}{32}}{1}$$

上記実験でリン数が 1~4 と変動している原因の 1 つとしては、精製段階でのモノフォスホエステラーゼの混入により、リン酸が脱離したことも考えられる。

同様にして求められた大腸菌 LPS、百日咳菌 LPS (分子量はそれぞれ $30,000$ と $8,000$ に仮定) の 1 分子当たりのリン数はそれぞれ 1.2 個、5 個であった。

⑤ ヘキソサミン含有量

エルソン-モルガン (Elson-Morgan) 法 (東京化学同人出版「生化学実験講座」No. 4 の 377~379 頁) に準拠して次の通りに行った。

CHF を蒸留水に溶解して 1 mg/mL の溶液を調製し、その $100 \mu\text{L}$ をスクリュウキャッ

特開平3-218466 (11)

ブケスビツツ(イワキガラス社製)に入れ、これに100μlの8NHClを加えて110℃で16時間加熱した。4NNaOHを約200μl添加してpH7とした。その100μlを分取し、別のスクリーキャップ付きスビツツに入れ、200μlの下記試薬Aを加えた後に、105℃で1.5時間加熱し、次いで流水で冷却した。次いで、100μlを分取し、670μlの96%エタノールを加え、更に、67μlの下記試薬Bを加えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測定した。検量線作製用試料としては、0.20~200μg/mlのN-アセチルグルコサミン(和光純薬社製)を使用した。

(試薬A) 75μlのアセチルアセトンと2.5mlの1.25N炭酸ナトリウムを混合して調製(試薬B) 1.6gのp-ジメチルベンズアルデヒドと30mlの濃硫酸と30mlの96%エタノールを混合して調製

結果、CHFのヘキサミン数は 8 ± 2 /分子(仮定分子量8,000)だった。同様にして前

定された大腸菌LPS(仮定分子量30,000)、百日咳菌LPS(仮定分子量8,000)のヘキサミン数はそれぞれ 4.5 ± 6 /分子、 1.6 ± 2 /分子だった。

脂肪酸含有量

90μlのCHF残留水溶液(1mg/ml)に10μlの内部標準(0.55mMのマルガリン酸)を加えた。1.0mlの0.5Mナトリウムメチラートを加えて脂肪酸エステルの加水分解とエステル化を行った。室温で1時間放置後に960μlの0.5NHClを加えて中和した。これに2mlのヘキサンを加えて15分間激しく攪拌した。次いで、1,000gで5分間遠心分離を行いヘキサン層を分取した。窒素ガスでヘキサンを蒸発させて、約20μlになるまで濃縮した。このサンプルをガスクロマトグラフィー[本体:島津社製のGC8APF、キャピラリーカラム:スベルコ(SpeliCo)社(カナダ)製FSCAP Sp2330、キャリアーガス:窒素]に付して脂肪酸量を測定した。脂肪酸量測定の高速

としては、第一化学薬品社製の合成リピドである大腸菌型LA-16-PP(分子量2,000で、1分子中の脂肪酸数は6であることが知られている)を用いた。

結果、CHFの脂肪酸数は 8 ± 2 /分子(仮定分子量8,000)であると推定された。同様にして推定された大腸菌LPS(仮定分子量30,000)、百日咳菌LPS(仮定分子量8,000)の脂肪酸数はそれぞれ18/分子、5/分子だった。

上記ガスクロマトグラフィーで観測されたチャートを添付図面第1~3図に示す。第1図はCHFの、第2図は大腸菌LPSの、第3図は百日咳菌LPSのチャートである。

第1~3図において、図示されている主要ピーク番号に対応する保持時間(分)は次の通りであった。

第1図: ピーク番号	保持時間(分)
1	2.450
2	2.758

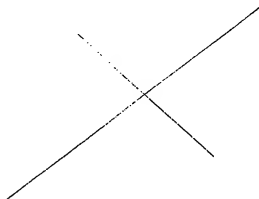
第2図: ピーク番号 保持時間(分)

1	2.417
2	2.742

第3図: ピーク番号 保持時間(分)

1	2.433
2	3.028

第1~3図の比較により、CHFのチャートは大腸菌LPSのチャートに似ているが、百日咳菌LPSのものとは大きく異なることは明白である。



実施例1 (リムラステスト陽性植物根腐質の定量)

各種植物に含まれるリムラステスト陽性植物根腐質の定量を、生化学工業株式会社のトキシカラースシステムを使って行った。

① 96穴の平底または丸底プレートに注射用蒸留水を1穴当たり180 μ l入れた。試料20 μ l (試料が固体の場合には注射用蒸留水に溶解して調製した)をプレートの穴の1つに加えた。プレートミキサーで攪拌しながらビッチングを行って10倍希釈液を調製した。(以後、順次希釈試料を20 μ lずつとり、同様に処理することで100倍、1000倍、...と10倍希釈系列液を調製できる。また、注射用蒸留水と試料の量比を変えることにより希釈率は任意に設定できる。)

② 内部標準として1.5 μ g/mlの大腸菌LPS溶液の100,000倍希釈液を調製し、希釈やリムラステスト発色が正常であることを確認した。

③ 上記①の10倍希釈液35 μ lを別のプレートの穴にとり、生化学工業株式会社のトキシカラ

ースシステムのLS-1セット35 μ lを追加し、37℃で30分間放置した。ついで105 μ lの1M酢酸水を加えて攪拌して反応を停止させた。この試料液の吸光度415nmでの吸光度を、96穴用分光光度計プレートリーダーMTP-100 (コロナ電気株式会社製)で測定した。バックグラウンドとしては蒸留水を、検量線作成用としては42pg/mlの生化学工業株式会社のトキシカラースシステムのET-1セットを使用して検量線を作成し、この検量線を基準にして各試料中のリムラステスト陽性植物根腐質の定量を行った。(試料が蒸留水である場合の吸光度を0とした。)

なお、この方法で精製LS-1セットを使用した場合には10~45pg/mlの範囲内で発色に定量化があることが確認されたので、この範囲に入らないとまは、希釈率を変えて再実験した。希釈試料の定量値は、

(検量線から読み取った値) \times (希釈率)
で計算した。

得られた結果を、固体試料の場合にはng/g

単位で、液体試料の場合にはng/ml単位で表2に示す。

なお、表中の試料の欄の会社名、地名等は、当該試料の入手先、産地をさす。かかる記載がない品はスーパーストア東武池袋の神奈川横浜久井原中野町店で購入した品で、製造者が不明なものを示す。

表 2

試料 (調性)	根腐質量 (ng)
種子植物	
松の實 (興南興業)	125
種子植物	
硬質系小麦種子 (千葉製粉)	2,250
硬質系小麦種子 (千葉製粉)	
(分子量5000以上)	1,000,000
硬質系小麦粉 (千葉製粉)	7,500
小麦ふすま (千誠製粉)	
(分子量5000以上)	300
小麦胚芽 (千葉製粉)	1,600

小麦胚芽 (千葉製粉)	
(分子量5000以上)	<10,000
玄米	1,100
米粉 (日本製粉)	
(分子量5000以上)	31,000,000
米粉か	29,000
米粉か (分子量5000以上)	500,000
コーンフラワー (大洋飼料)	
(分子量5000以上)	<0.3
コーングリッツ (大洋飼料)	
(分子量5000以上)	120
コーン (和光食糧)	200
クマ笹 (関本物産)	15,000
アヤメ (種子)	3,300
ニンニク (調製)	70
アスパラガス (芽)	4,500
エウガ (花房)	41,000
ヨクイニン (ウチダ和漢堂)	2,300
ハンゲ (松浦製薬)	5,500
バクモンノウ (船木天南堂)	4,000

特開平3-218466 (13)

ターメリック (エスビー食品)	195,000
<u>豆類</u>	
大豆 (三友食品)	150
大豆 (ほくれん) (分子量5000以上)	400
丹桂黒大豆 (和光食糧)	85
小豆 (和光食糧)	450
小豆 (和光食糧)	
(分子量5000以上)	36,000,000
ひたし豆 (和光食糧)	800
大正金時 (和光食糧)	550
大福豆 (和光食糧)	350
そら豆 (生)	750
ジャガイモ (ほくれん)	
(分子量5000以上)	<0.3
ビワ (種子)	800
アボガド (種子)	950
モモ (種子)	4,500
クルミ (種子)	1,900
ソラ豆 (種子)	750
カボチャ (種子)	10,000

ゼンマイ (関本物産)	10,000
<u>ソウ類</u>	
わかめ (三陸天然品)	11,000
わかめの芽株	200,000
ひじき (生)	85,000
芽ひじき (小暮本店)	105,000
ゴブ (ヤマトタカハシ)	235,000
アサクサノリ (乾燥生ノリ)	130,000
クロレラ	
(ヘルスタージャパンYS)	1,900,000
(マンナンフーズYS)	1,000,000

豆類

椎茸 (下仁田産)	16,000
えのき茸 (長野県中野市)	20,000
しめじ (静岡県宮城町)	40,000
まいたけ (大村産)	205,000
あわび茸 (羽生)	8,000
マッシュルーム	20,000
きくらげ	75,000
ナメコ	21,000

トマト (生の実)	10,500
カイワレダイコン (田を除く)	50,000
マタタビ (九久物産)	40,000
アマチャスル (K. K. 桜井)	73,000
ドラゲミ (滋養食品店)	
(帝京大学薬用植物園)	1,200
胡蘆 (白) (エスビー食品)	2,300
トウガラシ (興南貿易)	2,300
八角 (興南貿易)	5,500
ナツメグ (ライオン)	2,000
トウヒ (ウチダ和漢薬)	8,000
カッコン (新木天海堂)	3,000
甘草 (ウチダ和漢薬)	18,000
ニンジン (ウチダ和漢薬)	45,000
ボウフウ (新木天海堂)	50,000
カンボウイ (新木天海堂)	600,000
チョウトウゴウ (ウチダ和漢薬)	7,000
<u>シダ植物</u>	
スギナ (滋養食品店)	700
(帝京大学薬用植物園)	

エビオス	250,000
モ虫夏草	240,000

リムラステスト特性

飲料 (液体)

糖質質量 (g/g)

<u>ビール</u>		
キリン	ファインビールスター	1, 1 5 0
	ラガービール	1, 2 5 0
	ハートランド	1, 5 5 0
	ファインドラフト	1, 4 0 0
アサヒ	スーパーイースト	6 0 0

ワイン

サントリー	サントレージュ (白)	13
	(赤)	24
	シードル (アップル)	900

日本酒

大関一級 (大関酒造)	2.4
大関二級 (大関酒造)	1.7
大関三級 (大関酒造)	2.1
<u>玄米酒</u>	

日ター麒(大間酒造)	12
原価酒	
陶陶酒デカップ(陶陶酒本舗)	1.2
焼酎	
宝珠酒(宝珠造)	<2.0
その他	
キョーレオピン(清水製薬)	800
ニンニク抽出液(清水製薬)	350

実験例2

A. 内因性T.N.F.産生促進性の測定

①各群3匹のマウス(7週齢のメスC3H/H e 平均体重25g)の尾静脈に、プライマーとしての各抗体を溶解した生理的食塩水0.2mlを注射し、その3時間後にトリガーとしてOK-432を1KE[クリニッシュ アインハイト(Klinische Einheit)]系単位であり、1KEは0.1mgの乾燥細菌を含む製剤量にあたる]を溶解した生理的食塩水0.2mlを同じく尾静脈より投与した。トリガー投与

3日/H e。平均体重29g。)の尾静脈に、プライマーとしての実験例1で得られた粉末A-aを様々な量で含む生理的食塩水0.2mlを注射し、その3時間後にトリガーとしての1.0KE又は3.0KEのOK-432を生理的食塩水に溶解して総量を0.2mlとし、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の2時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてT.N.F.活性を測定した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第8図に示す。

第8図から、本発明のリムラステスト陽性植物抽出物が内因性T.N.F.産生促進能を発揮する量には差違量があることが推測される。

②別途、各群3匹のマウス(9週齢のオスC3H/H e。平均体重27g。)の尾静脈に、プライマーとしての実験例1で得られた粉末A-aを溶解した生理的食塩水0.2ml[大腸菌LPS量に換算して1μgの本発明のリムラステスト陽性植物抽出物を含む]を注射し、その3時間後にトリガーとしての1.0KE又は3.0KEの

の2時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてT.N.F.活性を測定した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第4図に示す。

この図から、本発明のリムラステスト陽性植物抽出物がOK-432と同程度の内因性T.N.F.産生促進能を示すことは明瞭である。又、本発明のリムラステスト陽性植物抽出物が内因性T.N.F.産生促進能を発揮する量には差違量があることも推測される。

③別途、各群3匹のマウス(7週齢のメスC3H/H e。平均体重25g)に、プライマーとしての各抗体を注射し(各抗体を200μlの生理的食塩水に溶解して、注射針で胃内に直接に投与)、その後は、上記静注の場合と同様に処理した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第5図に示す。

この図から、本発明のリムラステスト陽性植物抽出物が注射投与によっても内因性T.N.F.産生促進能を示すことは明瞭である。

④別途、各群3匹のマウス(12週齢のオスC

OK-432を生理的食塩水に溶解して総量を0.2mlとして、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の2時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてT.N.F.活性を測定した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第7図に示す。第7図において、横軸は、プライマーとトリガーとの投与間隔を示す。

第7図から、本発明のリムラステスト陽性植物抽出物が最適な内因性T.N.F.産生促進能を発揮するには、プライマーとトリガーとの投与間隔を考慮すべきことが推測される。

B. 内因性T.N.F.産生性の測定

①各群3匹のマウス(9週齢のオスC3H/H e。平均体重27g。)の尾静脈に、プライマーとしての実験例1で得られた粉末A-aを溶解した生理的食塩水0.2ml(大腸菌LPS量に換算して1ngの本発明のリムラステスト陽性植物抽出物を含む)又は生理的食塩水のみ0.2ml(対照群)を注射し、その3時間後にトリガーとしての0~10mgの粉末A-aを生理的

食塩水に溶解して総量を0.2 mlとして、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の1時間後に血清、肝臓、脾臓、肺を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第8図に示す。第8図において、左上は血清の、右上は肝臓の、左下は脾臓の、右下は肺のデータを示す。

第8図から、本発明のリムラステスト陽性植物精脂質がトリガーとしても有用であることが明らかである。

②前述、各群3匹のマウス(9週齢のオスC3H/He、平均体重29g。)の尾静脈に、次表3に示す様々なTNF(1,000単位)をプライマーとして含む生理的食塩水0.2 ml又は生理的食塩水のみ0.2 ml(対照群)を注射し、その3時間後にトリガーとしての1 mgの実施例1で得られた本発明の粉末A-aを生理的食塩水に溶解して総量を0.2 mlとして、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の1時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいて

③前述、各群3匹のマウス(9週齢のオスC3H/He、平均体重29g。)のマクロファージ細胞系を細胞200 μ l (2×10^6 個)/穴を96穴の平底プレートに入れ、プライマーとしての精製マウスIFN- γ (100単位/ml)を各穴に10 μ lを加え、その3時間後にトリガーとしての、実施例1記載の本発明の粉末A-a (2 mg/ml)を10 μ l/穴、又は大腸菌LPS (1 μ g/ml)を10 μ l/穴加えて2時間培養し、ピペットで各穴から130 μ lの上清を回収し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第10図に示す。図中、○は本発明のリムラステスト陽性植物精脂質である実施例1の粉末A-aの、●は大腸菌LPSのデータを示す。又、▲は粉末A-a及び大腸菌LPSの、L929に対する直接毒性を示す(共に値が0であった)。

第10図から、本発明のリムラステスト陽性植物精脂質の内因性TNF産生能が大腸菌LPSと

同程度であることを示した。結果を、各群3匹の平均として添付図面の第9図に示す。

表 3

使用したプライマー

r-TNF-S-AM2 (特開平1-95784号公報の実施例1に記載)

マウスTNF- α (前掲プロシーディング オブ ナショナル アカデミー サイエンス オブ ユーエスエー 92, 8060~8064頁, 1985年、に記載)

サイモン・J・TNF-San (Biochemically International, vol. 18, No. 3, 501~508頁, 1989年、に記載)

第9図から、本発明のリムラステスト陽性植物精脂質の内因性TNF産生能が、プライマーとして各種TNFを使用することにより、およそ30倍になることが明らかである。

同程度であることが明らかである。

第11図は、第10図に示された本発明のリムラステスト陽性植物精脂質の内因性TNF産生能と、リムラステストにより測定された本発明のリムラステスト陽性植物精脂質の含量とを対数正規確率紙に示した図である。

第11図から、本発明のリムラステスト陽性植物精脂質の含量と内因性TNF産生能との相関度が高くて高いこと、従って、又、本発明のリムラステスト陽性植物精脂質が内因性TNF産生能を有することは明らかである。

C. リン酸の処理によるTNF産生促進性。

産生能への影響)

①各群2匹のマウス(7週齢のオスC3H/He、平均体重25g。)の尾静脈に、リムラステストで1又は3 μ gのCHFを含む生理的食塩水0.2 mlを注射し、その1時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群2匹の平均として次表4に示す。

表—4—

トリガー	TNF活性 (単位/mk)
生理的食塩水(対照)	0
粉末A-a: 1μg	9.8±2.0
CHP(リン数1/分子)1μg	13.0±0.1
CHP(リン数1/分子)3μg	59.0±0.0

④各群2匹のマウス(7週齢のオスBALB/c、平均体重25g)の尾静脈に、プライマーとしての、リン数が1分子当たり3個と推定されるCHPの1ng(リムラス活性量)を含む、又はそれを含まない生理的食塩水0.2mlを注射し、その3時間後にトリガーとしての1KEのOK-432を生理的食塩水に溶解して総量を0.2mlとして、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の2時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。

結果を、各群2匹の平均として次表5に示す。

表—5—

検体	TNF活性 (単位/mk)
CHP - CHP	20±17
大腸菌LPS - 大腸菌LPS	20±13

上記表4～5に示された結果から、CHPの分子中にリンは最低1個あれば、TNF産生促進、産生能が低下することはないと推定される。

実験例3 (TNF産生所触媒作用の測定)

上記実験例1で得られた粉末A-aを生理的食塩水に懸濁し、得られた0.2mlの懸濁液(20μgの本発明のリムラステスト陽性植物体物質を含む)を各群3匹のマウス(雄雄マウスA相第7日齢のBALB/c雄マウス、平均体重24g)の尾静脈に注射し、その後5時間

結果を、各群2匹の平均として次表5に示す。

表—5—

プライマーとしてのCHP(リン数3/分子)の投与量(ng)	TNF活性 (単位/mk)
0	4.7±1.4
1	560±180

④各群2匹のマウス(7週齢のオスBALB/c、平均体重25g)の尾静脈に、プライマーとしての、リン数が1分子当たり3個と推定されるCHPの1ng(リムラス活性量)、又は大腸菌LPSの1ngを含む生理的食塩水0.2mlを注射し、その3時間後にトリガーとしての1μg(リムラス活性量)のCHP又は1μgの大腸菌LPSを生理的食塩水に溶解して総量を0.2mlとして、同じく尾静脈より投与した。トリガー投与の1時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。

従って血清、腫瘍組織、肝臓、脾、心臓におけるTNF産生量の経時変化を、これら各組織抽出液のL929細胞に対する毒性値を指標として測定した。

結果を、各群3匹の平均として添付図面の第12図に示す。第12図において、●は血清の、▲は腫瘍組織の、▽は肝臓の、□は脾の、■は心臓のデータを示す。

第12図より、腫瘍組織でのTNF産生が長時間に渡り持続されることが明らかである。

実験例4 (皮膚投与での免疫細胞活性化の測定)

A. 内因性TNF産生促進剤

④各群2匹の6週齢のオスBALB/c nu/nuマウス(体重19～23g)にプライマーとしての生理的食塩水のみを200ml(A群)か、前記実験例1で得られた1μgの粉末A-aを200mlの生理的食塩水に懸濁したもの(B群)を尾静脈から静注する。前記実験例1で得られた粉末A-aを1mg/ml含む50%グリ

セリン水溶液（C群）を腹部全体に20分間隔で3回又は6回注射した（1回注射量は100μl）。

③静注又は注射完了の3時間後にトリガーとしての1KEのOK-432を尾静脈から静注し、その2時間後に血清を採取して、各20μlのL929障害活性に基づいてTNF活性を測定した。結果を各群2匹の平均として次表7に示す。

表 7

A群	2単位/ml
B群	270単位/ml
C群	8単位/ml

B. カーボン除去率

①各群3匹の10週齢のオスのBALB/cマウス（平均体重24～29g）の腹部に一日一回、5日にわたって各回50μlの50%グリセリン水溶液（A群）か、前記実験例1で得られた筋束A-aを1mg/ml含む50%グリセリン水溶液（B群）か、大腸菌LPSを2μg/ml含む

50%グリセリン水溶液（C群）を注射し、D群には5日目のみに大腸菌LPSを15μg/ml含む200μlの生理的食塩水を尾静脈より静注した。

②各機体の最後の注射又は静注の2日後に、カーボンとしてロットリングインク アート581017（西陵ロットリング社製）を生理的食塩水で8倍希釈液として各マウスに体重の100分の1量を尾静脈から静注した。

③カーボン静注の5分後に採血し、各全血20μlを2mlの1%Na₂CO₃で希釈し、カーボン濃度をOD₆₅₀で光学的に測定した。結果を各群3匹の平均として次表8に示す。

表中、E群は、カーボン静注直後に採血をした群であり、カーボン除去率が「0」の場合に該当する。又、F群は、正常マウスの血球20μlの光学的データである（バックグラウンド）。

カーボン除去率は次式に従って、計算した。

$$(1 - \frac{\text{該当群のOD-F群の値}}{\text{E群の値-D群の値}}) \times 100$$

表 8

群	OD ₆₅₀ 吸光度	カーボン除去率(%)
A	0.547	24
B	0.450	53
C	0.480	44
D	0.320	93
E	0.625	0
F	0.296	—

実験例5（骨形成促進剤の測定）

①本群後18日目の臨終の左右の頸頂骨（左右各1本存在）を採取し、⁴⁵Ca（⁴⁵CaCl₂として0.5μCi/ml）を含む1mlの完全合成増殖地BGCJb-HW2（組成は以下に示す）の人った別々の試験管に入れ、水浴中で2時間培養して骨を⁴⁵Caで標識した。

表 9

成分	濃度(mg/l)
L-リジンHCl	240
L-ヒスチジンHCl・H ₂ O	150

L-アルギニンHCl	75
L-スレオニン	75
L-バリン	65
L-ロイシン	50
L-イソロイシン	30
L-メチオニン	50
L-フェニルアラニン	50
レトリプトファン	40
L-チロシン	40
L-シスチニンHCl・H ₂ O	90
L-グルタミン	200
グリシン	150
L-セリン	105
L-プロリン	115
ニコチン酸アミド	20
チアミンHCl	4
パントテン酸カルシウム	0.2
リボフラビン	0.2
ビリドキサールリン酸	0.2
亜鉛	0.2

特開平3-218466 (18)

ビチオン	0.2
p-アミノ安息香酸	2
α-リシン鹽トコフェロールNa	1
塩化コリン	50
m-イノシトール	0.2
シアノコバラミン	0.04
NaCl・乾燥物	8,000
KCl・乾燥物	400
CaCl ₂ ・無水	139.7
MgSO ₄ ・無水	97.7
Na ₂ HPO ₄ ・2H ₂ O	60.1
同上乾燥物	47.9
KH ₂ PO ₄	160
FeCl ₃ ・6H ₂ O	0.47
ブドウ糖・乾燥物	5,000
(以上の成分を蒸留水に溶解して全量を1gとし、 後に、以下の成分を添加する)	
牛血清アルブミン	10
NaHCO ₃	1,400
L-アスコルビン酸Na	50

1シンチレーター（英国アマシャム社製）に加え、
液体シンチレーションにて計数して、培地中への
¹⁴C 流出量を調べた。

④培養後の各頸頂骨をPBS（-）で洗浄後、
1mLの1NHClの入った培養管に移し、密栓後
に一晩室温で放置した。培地（各250μL）を
4、5mLのACSI1シンチレーターに加え、
液体シンチレーションにて計数して、骨に残存す
る¹⁴C量（¹⁴C 残存量）を調べた。結果を各
群5試料の結果として次表9に示す。

ベニシリンG-R塩	10
ストレプトマイシン	10
フェノールレッド	適量

③この培養後、各頸頂骨をPBS（-）（ニッ
スイ社製）で洗ひ、次いで、各1mLの非標識完
全合成培地BGJb-HW2を含む培養管に入れ
て密栓し、回転培養器を用い、30℃で一晩培養
した。この培養期間中に培地に放出された¹⁴Cは
は物理化学的交換反応に因るものであり、真の骨
吸収活性を反映するものではないと考え、培地は
廃棄した。

④左右の頸頂骨の一方を、1mLの非標識完全
合成培地BGJb-HW2のみが入った培養管に
入れ、他は、各種濃度の実施例1で得られた本発
明のリムラステスト阻性植物細胞質である粉末A
を含む1mLの非標識完全合成培地BGJb-H
W2が入った培養管に入れて密栓し、回転培養器
でさらに一晩培養を続けた。

⑤培地（各250μL）を4、5mLのACSI1

表 9

試料	¹⁴ C 流出率		T/C 比
	対照群 T	処理群 C	
PTH (1/mL) 1 単位	3.87	4.46	1.22
粉末 A (1/mL)			
10 μg	3.84	5.15	1.34
1 μg	4.47	5.05	1.13
0.1 μg	3.99	4.05	1.02
0.01 μg	3.98	3.97	1.00

PTH = 既知の骨吸収ホルモンである副甲状腺ホ
ルモンであり、その1単位は約1μgに
相当する。

上記表から明らかな通り、粉末Aの効果は用量
依存的に高まり、10μgの使用で、PTH約1

表 10

		X 群	Y 群	Z 群
鶏の産卵数 (各群6羽の合計)	投与中	80	66	63
	投与後	85	67	66
	合計 S	165	133	129
4 kg / cm ² 以上の殻強度を示した鶏卵の数(各群6羽の合計)	投与中	29	17	9
	投与後	24	17	7
	合計 T	53	34	16
T / S × 100 (%)		32	26	12

4.5 の効果を認める。PTH の供給は極めて少なく、しかも高価であるので、粉末 A 即ち本発明のリムラステスト陽性植物繊維質は PTH の極めて安価な、しかも大量に供給される代替品として使用できる。

実験例 8 (産卵促進能、卵殻強度増強能の測定)

前記実験例 1 で得られた粉末 A を水にといて一日当たり約 350 ml を 16 日間隔に与え、投与日を含めて 30 日間に渡り毎日、各鶏の産んだ卵の数、その卵の殻強度を調べた。なお、実験に当たっては、粉末 A の投与量の相違によって次の 3 群に分け、1 群は各 6 羽とした。

X 群: 600 mg / ms

Y 群: 60 mg / ms

Z 群: 水のみ(対照群)

結果を表 10 に示す。

上表 10 より、次の 3 点が明白である。

① 本発明のリムラステスト陽性植物繊維質である粉末 A を投与した X 群、Y 群においては、それを投与しない Z 群の場合よりも、産卵数が増している。特に、X 群の場合は 1.3 倍 (165 ÷ 129) に達している。従って、本発明のリムラステスト陽性植物繊維質には産卵促進能があると判断される。

② 本発明のリムラステスト陽性植物繊維質である粉末 A を投与した X 群、Y 群においては、それを投与しない Z 群の場合に比べ、産卵数に占める、殻強度が 4 kg / cm² 以上である卵の数の割合が 2 倍以上になっており、本発明のリムラステスト陽性植物繊維質には、優れた卵殻強度増強能があると判断される。

③ 上記産卵促進能、卵殻強度増強能は投与中止後も観察されるので、本発明のリムラステスト陽性植物繊維質の活性には優れた持続性があると判断される。

投与量、投与間隔、毒性価

本発明のリムラステスト陽性植物繊維質を免疫機能活性化剤として、或いは、動物用免疫機能活性化剤として投与するさいの量、投与間隔は、免疫機能活性化剤の本質上、当然、担当医師或いは獣医師により、患者の年齢、症状、産生 TNF 量から推定できる投与効果を勘案して個別に決定されるが、人間の成人 (50 kg) では、100% 純度の増製機品の場合は 0.1 ~ 200 μg が、1 回投与量の一応の目安となる。

なお、本発明のリムラステスト陽性植物繊維質は、純度 95% の機品の場合、6 週齢のマウス 3 匹 (BALB / c、オス、体重 18 ~ 23 g) に 50 mg / kg を静注後 48 時間観察したが死亡例はなく、又、人間の成人 (50 kg) 1 人当たり 15 g (活性成分量) を摂取しても特に急性毒性は観察されなかった。なお、大腸菌 LPS の上記と同種マウスにおける LD₅₀ は 8.4 mg / kg であるので、本発明のリムラステスト陽性植物繊維質は安全性が極めて高いと言える。

【発明の効果】

本発明のリムラステスト陽性植物油脂質は、従来の免疫機能活性化剤とは異なり、原料が人間その他の動物が不食しているものである点で安全性の問題は少なく、従って、化学療法併用が大きい。又、静注のみならず、経口投与、皮膚塗布もできるので投与上の便宜が大である。加えて、安価である。

更に、以上に述べたような特長を持つゆえに、特別の注意を払うことなく、常法により容易に医薬、化粧品、検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料その他の主成分として或は一成分として配合することができる。

4 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のリムラステスト陽性植物油脂質をガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを因示したチャートである。

第2図は、大腸菌LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを因示したチャートである。

第3図は、本発明のリムラステスト陽性植物油脂質の内因性TNF産生能を示すグラフである。

第4図は、本発明のリムラステスト陽性植物油脂質の内因性TNF産生能が、産生促進剤として各種TNFを使用すると段階的に増大することを示すグラフである。

第5図は、本発明のリムラステスト陽性植物油脂質の内因性TNF産生能を、大腸菌LPSとの比較で示すグラフである。

第6図は、第5図に示された本発明のリムラステスト陽性植物油脂質の内因性TNF産生能と、リムラステストによる当該植物油脂質の含量とを相対正規化率に示した図である。

第7図は、本発明のリムラステスト陽性植物油脂質の、TNF産生局所誘導作用を示す図である。

第8図において、○は内因性TNF産生剤(OK-432)の投与量が1、0KEの、●はそれが3、0KEの場合のTNF活性を示す。

第9図において、○は内因性TNF産生促進剤

存在を示すピークを因示したチャートである。

第3図は、百日咳菌LPSをガスクロマトグラフィーにかけて得られる、分子中における脂肪酸の存在を示すピークを因示したチャートである。

第4図は、静注した場合の、本発明のリムラステスト陽性植物油脂質の、内因性TNF産生促進能を、対照及び従来の免疫機能活性化剤との対比で示すグラフである。

第5図は、経口投与した場合の、本発明のリムラステスト陽性植物油脂質の、内因性TNF産生促進能を、対照及び従来の免疫機能活性化剤との対比で示すグラフである。

第6図は、本発明のリムラステスト陽性植物油脂質を内因性TNF産生促進剤として使用する際の産生促進作用発現における用量依存性を示すグラフである。

第7図は、本発明のリムラステスト陽性植物油脂質を内因性TNF産生促進剤として使用する際の産生促進作用発現における産生促進剤/産生剤投与間隔依存性を示すグラフである。

として生理的食塩水を、内因性TNF産生剤として本発明のリムラステスト陽性植物油脂質を使った場合の、●は内因性TNF産生促進剤、内因性TNF産生剤として本発明のリムラステスト陽性植物油脂質を使った場合の内因性TNF産生量を示す。左上のグラフは血清の、右上のグラフは肝臓の、左下は脾臓の、右下は肺のデータを示す。

第10図において、○は本発明のリムラステスト陽性植物油脂質の、●は大腸菌LPSのデータを示す。▲は本発明のリムラステスト陽性植物油脂質及び大腸菌LPSの、LB29細胞に対する選択毒性を示す(共に値は0である)。

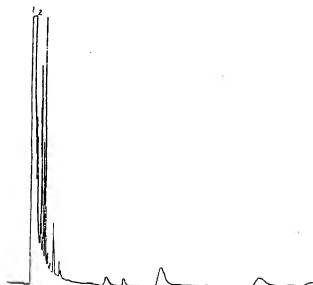
第11図において、○はTNF活性を、●はリムラステスト陽性植物油脂質の含量を示す。

第12図において、●は血清の、▲は脾臓、肝臓の、▽は肝臓の、□は肺の、■は脾臓のデータを示す。

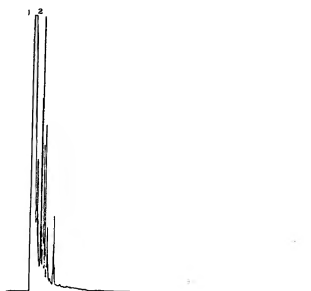
特許出願人 千葉製粉株式会社

代表者 須藤 俊樹 (ほか2名)

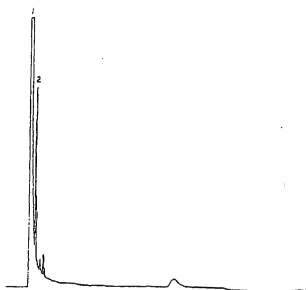
第 1 図



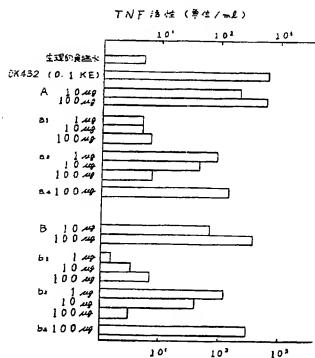
第 2 図



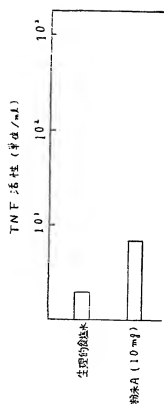
第 3 図



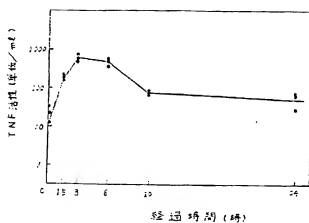
第 4 図



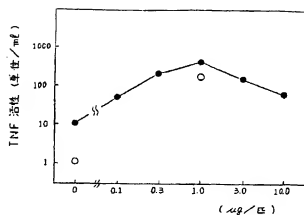
第 5 圖



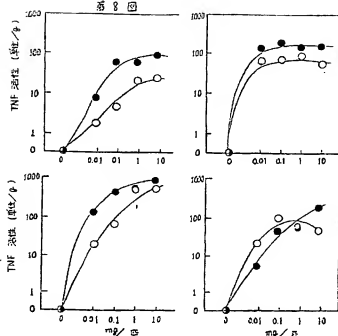
第 7 圖



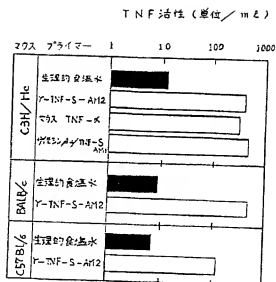
第 6 圖



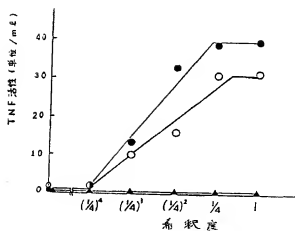
第 8 圖



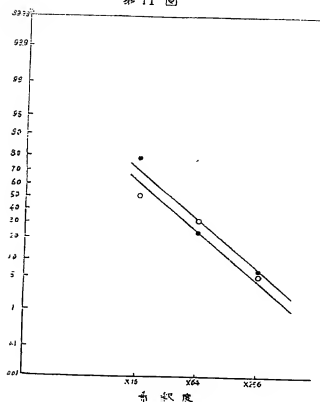
第 9 図



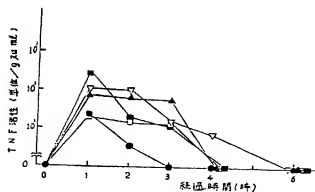
第 10 図



第 11 図



第 12 図



第1頁の続き

④Int.Cl. ⁹		識別記号	庁内整理番号
A 23 L	1/30	B	8114-4B
	2/00	A	6977-4B
A 61 K	7/00	J	9051-4C
		K	9051-4C
	37/20		8615-4C
// C 12 P	19/04	A B D	8214-4B
		A	8214-4B
		B	8214-4B
(C 12 P	19/04		
C 12 R	1:89)		
(C 12 P	19/04		
C 12 R	1:645)		

優先権主張 ④平1(1989)10月2日⑤日本(JP)④特願 平1-255210

④発明者 水野 伝一 神奈川県鎌倉市岡本18

④発明者 大島 治之 東京都八王子市館町1097 館ヶ丘団地2-10-513

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.